

# 백출의 파골세포 분화에 미치는 영향

박성태 · 이명수 · 전병훈<sup>1</sup> · 박기인<sup>2</sup> · 오재민<sup>3\*</sup>

원광대학교 의과대학 내과학교실, 1: 한의과대학 병리학교실, 2: 전북대학교 자연과학대학, 3: 의과대학 해부학교실

## Effect of *Atractylodis Rhizoma Alba* on Osteoclast Formation

Sung Tae Park, Myeung Su Lee, Byung Hun Jeon<sup>1</sup>, Kie-In Park<sup>2</sup>, Jae Min Oh<sup>3\*</sup>

*Department of Internal Medicine, Division of Rheumatology, 1: Department of Pathology, Collage of Oriental Medicine, Wonkwang University, 2: Division of Biological Science, School of Natural Science, Chonbuk National University, 3: Department of Anatomy, Collage of Medicine, Wonkwang University*

*Atractylodis Rhizoma Alba* is commonly used herbal medicine and it has been known that has immuno-regulatory effects and anti-cancer effects. The inhibition of osteoclastogenesis is essential for the prevention and treatment of osteoporosis. The aim of this study was to evaluate the effects of *Atractylodis Rhizoma Alba* on osteoclast differentiation in vitro and on resorbing activity of osteoclast. Osteoclast formation was evaluated in bone marrow cells (BMC) in the presence or absence of *Atractylodis Rhizoma Alba*. The expression of c-fos, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), OSCAR, DC-STAMP, cathepsin K, MafB and NFATc1 mRNA in osteoclast precursor were assessed by RT-PCR. The levels of TNF receptor-associated factor-6 (TRAF-6), c-fos and NFATc1 protein were assessed by Western blot analysis. Also the correlation with MAPKs and NF-κB pathways were measured by using Western blot analysis. With bone resorption study, I tried to evaluate the inhibitory effects of *Atractylodis Rhizoma Alba* on mature osteoclast function. *Atractylodis Rhizoma Alba* inhibited the RANKL induced osteoclastic differentiation from bone marrow macrophage in a dose dependant manner without cellular toxicity. Gene expression of c-fos and NFATc1 was significantly down regulated with *Atractylodis Rhizoma Alba* treatment. *Atractylodis Rhizoma Alba* markedly inhibited the RANKL-induced osteoclastogenesis through suppression of nuclear factor kappa b (NF-κB) pathway, down stream pathway of p38, ERK and JNK pathway. Taken together, I concluded that *Atractylodis Rhizoma Alba* have beneficial effect on osteoporosis by inhibition of osteoclast differentiation and by inhibition of functioning osteoclast. Thus I expect that *Atractylodis Rhizoma Alba* could be a treatment option for osteoporosis.

Key words : Osteoclast, *Atractylodis Rhizoma Alba*, Osteoporosis

### 서 론

골다공증은 증상이 없이 뼈의 강도를 약화시켜 골질의 위험성을 증가시키므로 고령의 인구가 증가할수록 예방과 치료에 대한 사회적인 관심이 증가하고 있다. 특히 골다공증의 가장 심각한 합병증인 고관절 골절은 골절이후 생존율을 현저히 감소시키는데, 보고에 의하면 골절 후 5년 내 사망률이 20%에 달한다고 한다<sup>1)</sup>. 또한 한 번의 고관절 골절을 경험한 환자에게서는 척추 골절이 발생할 확률이 2.5배 증가하고 고관절 골절이 발생할 확

률은 2.3배 증가하는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>.

골은 조골세포에 의한 골의 생성과 파골세포에 의한 골의 흡수가 균형을 맞추어 항상성을 유지하며 이 과정에서 특히 골의 파괴를 담당하는 파골세포의 역할이 매우 중요하다고 알려져 있다<sup>3)</sup>. 임상적으로 파골세포의 기능을 억제하여 골 흡수를 줄이는 것이 골다공증의 치료에 주로 이용되고 있는데 대표적으로 사용되고 있는 약물이 bisphosphonates 제제이다<sup>4)</sup>. 이러한 bisphosphonate 약물은 파골세포의 세포사멸을 촉진하고 파골세포가 골 흡수 표면에서 골 흡수 기능을 수행하는데 기계적인 저해 효과를 가지는 것으로 알려져 있고<sup>5)</sup> 또한 파골세포의 분화를 억제하는 기능이 있음이 보고되었다<sup>6)</sup>. 그러나 이러한 약제들은 이미 알려진 골다공증에 대한 효과에도 불구하고 하악골 괴사와

\* 교신저자 : 오재민, 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의과대학 해부학교실

· E-mail : jmoh@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6757

· 접수 : 2011/01/04 · 수정 : 2011/02/10 · 채택 : 2011/02/14

같은 심각한 부작용이 알려지면서<sup>7)</sup> 부작용이 없는 대체 약물을 찾기 위한 노력이 지속되고 있다. 전통적인 한약제 중에서 녹용이 파골세포 분화를 억제하는 작용이 있음이 보고되었고<sup>8)</sup> 오미자 추출물도 파골세포 분화 억제에 효과가 있는 것으로 보고되었다<sup>9)</sup>.

백출(*Atractylodes Rhizoma alba*)은 국화과에 속하는 다년생 식물로 특이한 냄새가 있고 맛은 약간 쓰며 점성이 있으며 한의학에서는 감초처럼 대부분의 약에 첨가되어 사용되고 있는 약제이다. 백출은 진정 작용, 이뇨 작용, 진통 작용, 혈압 강화 작용, 혈당 조절 작용 등이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 백출은 항염 작용이 있어 염증 치료에도 가능성이 있는 약제이다<sup>10)</sup>. 폐암 등에서 항암 효과도 있는 것으로 알려져 있으나<sup>11)</sup> 아직까지 뼈에 대한 어떠한 연구도 알려지지 않은 상황이다. 무엇보다도 골 흡수에 파골세포의 분화와 기능이 중요하므로 백출 물 추출물의 파골세포 분화와 골 흡수에 미치는 영향은 아직 연구된 바가 없다. 골 흡수에 주된 기능을 하는 파골세포 분화에는 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)와 receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)의 자극이 필수적인데 이러한 자극을 받은 후 여러 가지 전사인자의 발현이 발생하고 이 중 NF- $\kappa$ B, c-Fos, nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 등이 파골세포의 분화에 중요하다고 알려져 있다<sup>12)</sup>. 본 연구에서는 RANKL에 의한 파골세포 분화에 백출 물 추출물이 어떤 영향을 미치는지를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

본 연구에는 백출을 물로 추출하여 감압 농축한 후 동결 건조하여 파우더 형태를 얻어 사용하였다. 파골세포 분화 촉진을 위한 M-CSF와 RANKL은 Peprotech (London, UK)에서 구입했다. Actin 항체, TRAP은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입했다. c-Fos와 NFATc1에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하여 사용하였다. Phospho (p)-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-P38, P38, I- $\kappa$ B에 대한 항체는 Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA)의 제품을 사용했다. XTT assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서 구입했다.

### 2. 파골세포 배양 및 확인

5주령 ICR 생쥐를 희생시킨 후 경골과 대퇴골을 채취하여 골의 속질 공간을 1cc 주사기로 수세하여 골수세포를 얻었다. 분리된 골수세포는 10% fetal bovine serum (FBS), 항생제, M-CSF (30 ng/ml)가 포함된  $\alpha$ -minimum essential medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) ( $\alpha$ -MEM) 배지에서 3일간 배양하였다. 3일 후, 부착된 세포를 대식세포 (bone marrow macrophage, BMM)로 사용하였고, 이러한 대식세포는 M-CSF (30 ng/ml)와 RANKL (100 ng/ml)을 첨가하여 배양하면서 백출 물 추출물을 각각 농도 별로 처리하였다. 4일 후, 배양한 세포는

TRAP 용액 (Sigma Aldrich, USA)으로 세포를 염색하여 염색된 세포를 현미경으로 관찰하고 수를 세었다.

### 3. 백출 물 추출물의 독성검사

생쥐에서 얻은 대식세포를 96-well plate에  $1 \times 10^4$ /well의 농도로 분주한 후 M-CSF (30ng/ml)와 함께 백출 물 추출물을 각각의 농도별로 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일간 배양 후 각각의 plate에 XTT reagents (Roche Applied Science)를 50 ul 첨가하고 4시간 배양하였다. 4시간 배양 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. 역전사 중합반응 (RT-PCR) 분석

TRI reagent (Invitrogen)를 이용하여 세포내 RNA를 분리하였고, cDNA를 합성하기 위해 1  $\mu$ g RNA, 10  $\mu$ M oligo dT 와 10 mM dNTP를 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 first strand buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>), 100 mM DTT, RNase inhibitor와 reverse transcriptase를 사용하였다. 합성된 cDNA는 c-fos, NFATc1, TRAP, OSCAR, Cathepsin K, DC-STAMP, MafB 과 GAPDH 유전자 증폭을 위해 사용되었고, 사용된 primer는 다음과 같다.

c-Fos sense, 5' - CTGGTGCAGCCCACTCTGGTC - 3';  
 c-Fos antisense, 5' - CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC - 3';  
 NFAT c1sense, 5' - CAACGCCCTGACCACCGATAG - 3';  
 NFATc1 antisense, 5' -GCTGCCCTCCGTCTCATAGT - 3';  
 TRAP sense, 5' - ACTTCCCCAGCCCTTACTAC - 3';  
 TRAP antisense, 5' - TCAGCACATAGCCCACACCG-3';  
 OSCAR sense, 5'-CTGCTGGTAACGGATCAGCTCCCCAGA-3';  
 OSCAR antisense,  
 5'-CCAAGGAGCCAGAACCTTCGAAACT-3';  
 MafB sense, 5'-AGCAGGTGTGACTCAGGATG-3';  
 MafB antisense, 5'-CCTTGTAGCGTCTCTCTCG-3';  
 DC-STAMP sense 5'-GCAAGGAACCCAAGGAGTCG-3';  
 DC-STAMP antisense 5'-CAGTTGGCCAGAAAGAGGG-3';  
 Cathepsin K sense 5' -CAGCAGAACGGAGGCATTGA-3' ;  
 Cathepsin K antisense 5' -CCTTTGCCGTGGCGTTATAC-3' ;  
 GAPDH sense, 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC - 3';  
 GAPDH antisense, 5' -TCCACCACCTGTTGCTGTA - 3'.

PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 30 초, 58 $^{\circ}$ C에서 30 초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 씩 PCR 조건으로 23회 반복하여 증폭된 cDNA는 1% agarose gel 에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후에 UV상에서 관찰하였다.

### 5. Western blot 분석

백출 물 추출물을 1시간 전에 처리하거나 처리하지 않은 세포들은 lysis buffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1% deoxycholate, and protease inhibitors)를 이용하여 단백질을 추출 한 후 20분동안 14,000 rpm으로 원심분리 한 후

Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 단백질 정량을 수행하였다. 동일한 농도의 단백질은 10% SDS-PAGE gel 상에서 전기영동 시킨 후 PVDF membrane에 이동 시키고 비 특이 단백질이 붙는 것을 방지하기 위해 5% non-fat dry milk를 처리했다.

1차 항체를 처리하고 TBS-T 완충용액으로 세척한 후 2차 항체를 처리하였고 각각의 항체를 이용하여 Western blot 분석을 실시하였다. 각각 단백질의 발현정도를 확인하기 위해 ECL(enhanced chemiluminescence)을 이용하여 x-ray 필름에 노출시켜 확인하였다.

### 6. 골 흡수능 분석

골수세포와 조골세포의 동조배양으로 얻은 성숙 파골세포를 hydroxyapatite-coated 48-well plate에 첨가하고, 1시간 배양하였다. 1시간 후, trypsin을 처리하여 조골세포를 제거하고 M-CSF (20 ng/ml) 또는 RANKL (500 ng/ml)을 처리 후 백출물 추출물과 함께 6시간 배양하였다. 세포는 증류수로 수세하여 제거하고, 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다. hydroxyapatite 흡수 영역은 Image Pro-plus program version, 4.0 (Media Cybernetics)을 사용하여 정량화 하였다.

### 7. 통계 분석

본 실험은 3번 이상의 동일 실험을 반복하였으며 통계처리는 각각의 결과를 평균±표준편차로 표시하였고 각각 군별로 차이가 있는지 알아보기 위해 SPSS를 이용하여 신뢰수준 0.05에서 일원배치분산분석(ANOVA)을 시행하고, Duncan's multiple range test로 사후검정을 실시하였다.

## 결 과

#### 1. 백출 물 추출물이 파골세포의 분화에 미치는 효과

백출 물 추출물이 파골 세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 골수에서 얻은 대식세포를 적정 농도의 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골 세포 분화를 유도하고 4일 동안 배양 조건에 맞춰 각각 백출 물 추출물을 농도별로 처리한 결과 M-CSF와 RANKL만을 처리한 대조군에 비해 백출 물 추출물을 같이 처리한 경우, 농도 의존적으로 TRAP 양성 파골세포의 형성이 의미 있게 억제되었고(Fig. 1A) 여러 개의 핵을 가지고 있는 성숙한 파골세포의 수도 의미있게 백출 물 추출물에 의해 감소됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B).

#### 2. 백출 물 추출물의 세포 독성 결과

실험에 이용된 백출 물 추출물의 농도에서 세포의 독성을 알아보기 위해 생쥐에서 얻은 대식세포에 M-CSF (30ng/ml)와 함께 백출 물 추출물을 각각의 농도별로 첨가하여 3일간 배양 후 각각의 XTT 검사를 시행하였는데 파골세포 분화의 억제를 야기한 백출 물 추출물의 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 2). 이를 통해 백출 물 추출물의 파골세포 억제 효과가 세포

독성에 의한 것이 아니라 약물 자체의 효과임을 알 수 있었다.

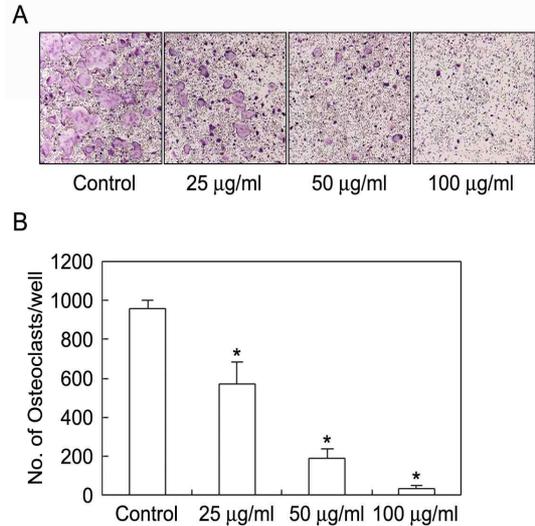


Fig. 1. Effect on osteoclast differentiation by water extract of *Atractylodis Rhizoma Alba* (ALA). (A) BMMs were cultured for 4 days with M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml) in the presence of water extract of ALA. Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and stained with TRAP solution. TRAP-positive cells were photographed under a light microscope (Magnification: x100). (B) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts. \* P < 0.05 vs control.

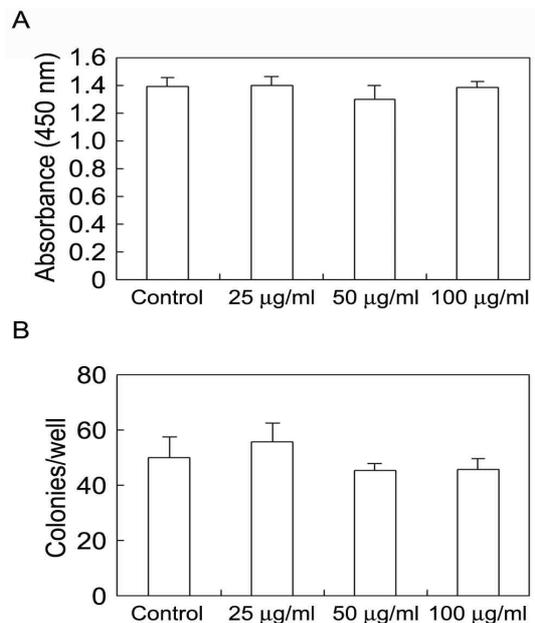


Fig. 2. Toxicity assay of ALA extract. (A) BMMs were seeded into a 96 well plate and cultured for 3 days in the presence of M-CSF (30 ng/ml) and with the indicated concentrations of water extract of ALA. After 3 days, the absorbance was measured at 450 nm using an ELISA reader. (B) BMMs were cultured for 3 days with or without ALA extract. After 3 days, cultured cells were fixed and stained with hematoxylin. Colonies containing 50 or greater cells were counted.

#### 3. RANKL의 자극에 c-fos, NFATc1, TRAP, OSCAR, Cathepsin K, DC-STAMP, MafB 의 mRNA 발현에 미치는 백출 물 추출물의 효과

RANKL, M-CSF 자극으로 파골 세포의 분화를 유도 했을 때

백출 물 추출물을 처리하지 않은 경우에서 12시간에서 24시간 배양 시 파골세포의 분화와 골 흡수능에 중요한 역할을 하는 c-fos, NFATc1, TRAP, OSCAR, Cathepsin K, DC-STAMP의 mRNA 발현이 증가하였고 파골세포 분화에 억제 작용을 하는 것으로 알려진 MafB의 mRNA 발현은 억제 되었다. 그러나 백출 물 추출물을 처리한 경우 파골 세포 분화에 필수적인 c-fos, NFATc1, TRAP, OSCAR, Cathepsin K, DC-STAMP의 mRNA 발현이 현저하게 감소하였고 MafB의 mRNA 발현은 증가 되었다(Fig. 3). 이를 통해 백출 물 추출물의 파골세포 분화 억제 효과가 파골세포 분화에 핵심적인 유전자인 c-Fos, NFATc1등의 발현 감소와 억제 유전자로 알려진 MafB의 증가에 의한 것임을 알 수 있었다.

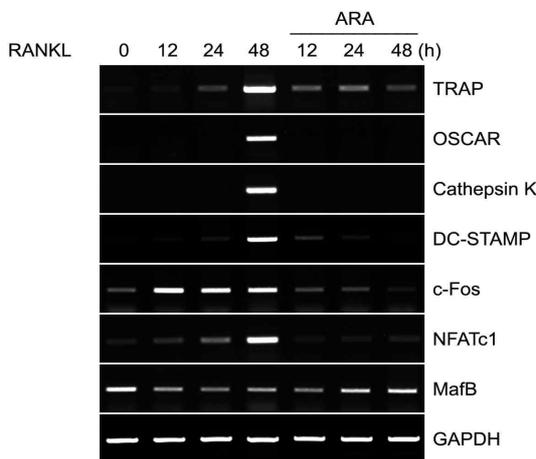


Fig. 3. Effect of water extract of ALA on gene expression that are associated with osteoclast differentiation. BMMs were pretreated with or without water extract of ALA (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1h and then treated with RANKL (100  $\text{ng}/\text{mL}$ ) for the indicated time. Total RNA from the cells was obtained and the level of expression of the mRNA of the indicated genes was analyzed by RT-PCR.

4. c-fos, TRAP 6, NFATc1의 단백질 발현에 미치는 백출 물 추출물의 효과

파골세포 분화에 필수적인 c-Fos, TRAP 6, NFATc1 의 단백질 발현에 미치는 백출 물 추출물의 영향을 알아보기 위해 RANKL, M-CSF 를 이용하여 파골세포 분화를 유도하면서 백출 물 추출 물을 처리하거나, 처리하지 않은 경우에서 각각 c-Fos, TRAP 6, NFATc1의 발현을 측정하였다. 파골 세포 분화를 유도한 후, 백출 물 추출물을 처리하지 않은 경우에서는 48시간 배양 후 western blotting 검사에서 c-Fos, TRAF 6, NFATc1 의 단백질 발현이 증가하였는데, 백출 물 추출물을 처리한 경우에는 TRAF 6를 제외하고, 48시간 까지 증가하였던 c-fos, NFATc1의 단백질 발현이 현저하게 감소하였다(Fig. 4).

5. 백출 물 추출물이 RANKL에 의한 신호 전달 체계에 미치는 영향

파골세포 분화에 필수적인 RANKL에 의한 신호가 전달되면 p38, JNK, ERK 등의 MAP kinase와 그 아래 신호전달 물질인 전사인자 NF- $\kappa$ B를 통해 파골세포의 분화 신호가 전달되는데, 백출

물 추출물을 처리하였을 경우 RANKL에 의한 신호 전달 물질 중 JNK, ERK는 오히려 활성화되었지만 이 신호의 하부 신호전달 물질인 전사인자 NF- $\kappa$ B의 활성이 감소되었다(Fig. 5). 이를 통해 백출 물 추출물의 파골세포 분화의 억제 효과는 RANKL과 JNK, ERK 경로의 아래에서 파골세포의 분화 신호를 전달하는 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제함으로써 이루어짐을 알 수 있었다.

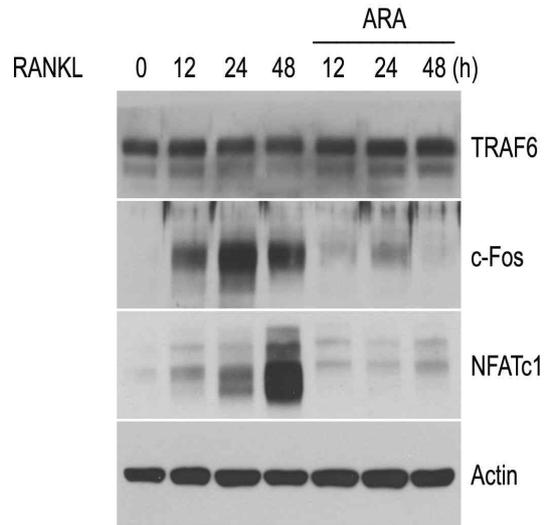


Fig. 4. Effect of water extract of ALA on the expression of TRAF 6, c-Fos and NFATc1. (A) BMMs were pretreated with or without water extract of ALA (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1h and then treated with (100  $\text{ng}/\text{mL}$ ) RANKL for the indicated time. The cells were lysed in lysis buffer, then resolved by SDS-PAGE and western blotting with antibodies against TRAF6, c-Fos and NFATc1 and actin.

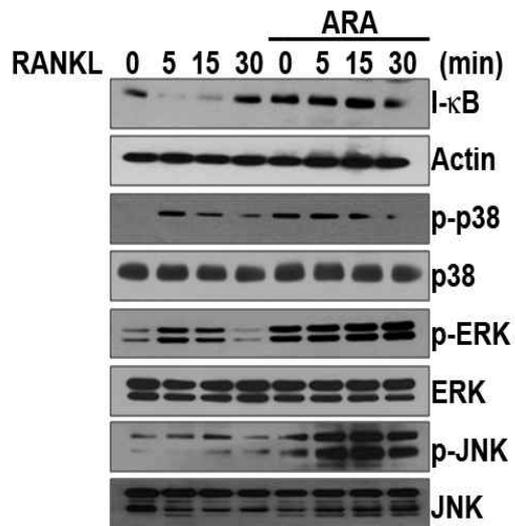


Fig. 5. Effect of water extract of ALA on phosphorylation of MAPK. BMMs were starved for 2 h, pretreated with water extract of ALA (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1h, and then stimulated with RANKL (100  $\text{ng}/\text{mL}$ ) for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western blotting with antibody against p-p38, p38, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-I $\kappa$ B, I- $\kappa$ B and actin.

6. 백출 물 추출물이 골 흡수능에 미치는 영향

hydroxyapatite를 통한 파골세포의 골 흡수 능력을 실험한 결과 백출 추출물을 파골세포와 같이 처리하지 않은 경우에는

hydroxyapatite 흡수 범위가 넓은 결과와 비교하여 hydroxyapatite를 처리한 경우에는 현저하게 흡수 범위가 감소하였다(Fig. 6).

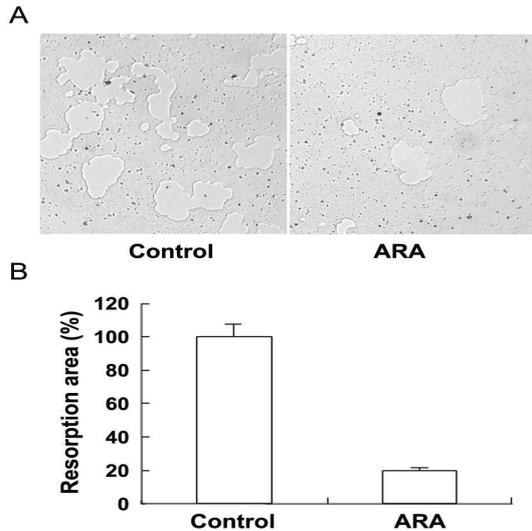


Fig. 6. Effect of ALA extract on bone resorption. Mature osteoclasts were plated on hydroxyapatite-coated 48-well plates and then treated with M-CSF (20 ng/ml) or RANKL (1000 ng/ml) for 6 h in the presence or absence of ALA extract. (A) Cells were removed from the plates and photographed under a light microscope. (B) Pit area was quantified using Image Pro-plus program, version 4.0.

## 고찰

고령의 인구가 늘어나면서 골다공증으로 인한 골절이 삶의 질에 영향을 미치는 경우가 흔하게 일어나므로 골다공증의 치료가 최근 관심이 되고 있다. 임상에서 골다공증의 치료에 많이 사용되고 있는 약제중의 하나가 bisphosphonate 계열의 약물인데 이는 hydroxyapatite와 결합하여 파골세포의 골 흡수를 저해하거나 파골세포의 세포사멸을 유도하는 기전을 가지고 있다. 그러나 골다공증이 주로 고령의 환자에서 발생하는데 고령의 환자에서 치과적인 문제가 동반되는 경우가 많아 최근 심각한 부작용으로 알려진 턱의 골괴사로 인하여<sup>13)</sup> 일반적인 사용에 유의해야 한다. 이러한 이유로 부작용이 적은 새로운 골다공증 치료제의 개발이 요구되고 있다. 본 연구에서 골다공증 치료에 응용하기 위해 연구하였던 백출은 국화과에 속하는 다년생 식물로서 감초처럼 한의학에서 주로 많이 사용되어 오면서 일반적으로 진정 작용, 이노 작용, 진통 작용, 혈압 강화 작용, 혈당 조절 작용 등이 있는 것으로 알려져 있다. 백출 물 추출물을 이용하여 파골세포의 분화에 미치는 영향을 연구한 것은 골다공증의 치료에 응용될 수 있는 한약제의 가능성을 살펴보기 위한 것이었다.

본 연구에서 백출 물 추출물은 낮은 농도인 25µg/ml 에서부터 RANKL에 의해 유도되는 파골세포의 생성을 억제하였고 농도가 100µg/ml 까지 증가될수록 파골세포 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. c-Fos, NFATc1의 발현이 파골세포의 분화에 중요한 인자로 알려져 있고 이러한 물질의 발현을 백출 추출물이 억제한다는 것은 파골세포 분화 억제에 핵심적인 물질을 억제한다

는 의미를 가진다<sup>14)</sup>. 또한 본 실험을 통해 백출 물 추출물이 파골세포 분화에 관련된 주요 경로를 저해하는 것뿐만 아니라 c-fos, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), osteoclast-associated receptor(OSCAR) cathepsin K 유전자의 발현도 억제하는 것으로 나타났다. 이는 성숙한 파골세포에서 발현되는 유전자로서 성숙한 파골세포로의 분화 억제에 백출이 명백한 역할을 하는 것을 의미한다. TRAP은 정확한 기능이 알려져 있지 않았지만, 파골세포에서 분비되는 단백질로 knockout 연구에서 TRAP-/- mice의 osteoclast activity가 감소하고, TRAP을 overexpression 한 transgenic mice에서는 osteoporosis 가 관찰되어 TRAP의 중요성을 알려져 있다<sup>15)</sup>. 본 실험에서 백출 물 추출물이 성숙한 파골세포로의 분화과정에 필수적인 과정으로 세포 융합에 관여하는 유전자인 dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)의 발현을 억제한다는 것을 확인 하였다. DC-STAMP의 발현이 결핍된 쥐에서는 여러 개의 핵을 가진 파골세포로의 분화가 현저히 억제 될 뿐만 아니라 골 흡수도 일어나지 않는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>. 백출에 의해 DC-STAMP 유전자의 발현이 억제됨을 통해, 단백을 가진 파골세포의 전구 세포가 성숙한 파골세포로의 융합 과정이 저해 받을 수 있다. 파골세포 분화를 억제하는 조절인자로 알려진 MafB는 파골세포의 전구세포에서 발현이 현저히 증가되며 RANKL의 자극에 의해 발현이 억제되고, MafB가 과도하게 발현되면 bone marrow macrophages (BMMs)에서 RANKL에 의한 NFATc1과 OSCAR의 발현이 억제 되는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. 본 실험에서 RANKL에 의해 억제되는 MafB가 백출 물 추출물에 의해 발현이 억제되지 않아 파골세포분화에 억제 조절인자로 알려진 MafB의 발현을 증가시키는 작용이 있음을 알 수 있었다. RANKL에 의한 자극이 ERK, p38, JNK 등 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로를 통하여 신호가 전달되는데 이는 세포의 성장과 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>18)</sup>. 그러나 본 실험 결과에서 백출 물 추출물은 파골세포의 분화를 억제함에도 불구하고 ERK, JNK의 인산화를 촉진하였다. 즉 백출 물 추출물은 파골세포는 RANKL에 의해 유도된 MAPKs 경로를 활성화시키지만 그 아래 신호경로인 NF-kB의 활성화를 억제함으로써 파골세포의 분화를 억제하는 것으로 생각되어진다.

성숙한 파골세포의 숫자가 같더라도 actin ring 형성에 관여하는 유전자의 발현 등이 골 흡수능에 영향을 미칠 수 있다<sup>19)</sup>. 본 연구에서는 hydroxyapatite를 이용하여 파골세포의 골 흡수 기능여부에 대하여 백출 물 추출물이 파골세포의 분화뿐만 아니라 골 흡수능의 억제 역할을 하고 있음을 알게 되었다.

## 결론

최근 골다공증이 사회 문제화 되면서 천연물질 중에서 골다공증에 효과가 있는 물질을 찾는 시도가 이루어지고 있다. 파골세포의 분화를 억제하는 것이 골 흡수를 억제하여 골다공증을 치료 및 예방하는데 중요한데 백출 물 추출물이 파골세포의 분화의 주요 경로를 억제함으로써 파골 세포 분화를 억제하는 작용

이 있음을 확인 하였고, 이러한 물질이 파골세포 분화뿐만 아니라 골 흡수 기능을 억제함을 확인하였다. 이를 통하여 백출 및 그 추출물이 골다공증 치료에 응용될 수 있는 가능성을 확인하였고 임상에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

이 논문은 2008년도 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Cooper, C., Atkinson, E.J., Jacobsen, S.J., O'Fallon, W.M., Melton, L.J. population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol* 137(9):1001-1005, 1993.
- Klotzbuecher, C.M., Ross, P.D., Landsman, P.B., Abbott, T.A., Berger, M. Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. *Bone Miner Res* 15(4):721-739, 2000.
- Goltzman, D. Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat Rev Drug Discov* (10):784-796, 2002.
- Rodan, G.A., Martin, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289(5484):1508-1514, 2000.
- Nishikawa, M., Akatsu, T., Katayama, Y., Yasutomo, Y., Kado, S., Kugal, N., amamoto, M., Nagata, N. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone* 18: 9-14, 1996.
- Kwak, H.B., Kim, J.Y., Kim, K.J., Choi, M.K., Kim, J.J., Kim, K.M., Shin, Y.I., Lee, M.S., Kim, H.S., Kim, J.W., Chun, C.H., Cho, H.J., Hong, G.Y., Juhng, S.K., Yoon, K.H., Park, B.H., Bae, J.M., Han, J.K., Oh, J. Risedronate directly inhibits osteoclast differentiation and inflammatory bone loss. *Biol Pharm Bull.* 32(7):1193-1198, 2009.
- Solomon, D.H., Rekedal, L., Cadarette, S.M. Osteoporosis treatments and adverse events. *Curr Opin Rheumatol.* 21(4):363-368, 2009.
- Kwak, H.B., Kim, J.H., Kim, D.J., Kwon, Y.M., Oh, J.M., Kim, Y.K. Effect of water extract of deer antler in osteoclast differentiation. *Korean J Oriental Physiology & pathology* 22: 891-895, 2008.
- Lee, Y., Lee, H.S., Jang, S.J., Song, J.H. Effect of Water Extract of Schisandra Chinensis on Osteoclast Differentiation. *Korean J Oriental Physiology & pathology* 24, 2010.
- Eum, H.A., Lee, W.Y., Kim, S.H., Kim, J.Y., Park, S.W., Lee, J.S., Choi, S.M., Pyo, S., Kang, M.J., Min, Y.D., Shim, S.H., Shin, D.H., Lee, S.M. Anti-inflammatory activity of CML-1: an erbal formulation *Am J Chin Med.* 33(1):29-40, 2005.
- Kamei, T., Kumano, H., Iwata, K., Nariai, Y., Matsumoto, T. The effect of a traditional Chinese prescription for a case of lung carcinoma. *J Altern Complement Med.* 6(6):557-559. 2000.
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E.F., Mak, T.W., Kodama, T., Taniguchi, T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell.* 3: 889-901, 2002.
- Yarom, N., Yahalom, R., Shoshani, Y., Hamed, W., Regev, E., Elad, S. Osteonecrosis of the jaw induced by orally administered bisphosphonates: incidence, clinical features, predisposing factors and treatment outcome. *Osteoporos Int.* 18(10):1363-1370. 2007.
- Ikeda, F., Nishimura, R., Matsubara, T., Hata, K., Reddy, S.V., Yoneda, T. Activation of NFAT signal in vivo leads to osteopenia associated with increased osteoclastogenesis and bone-resorbing activity. *J Immunol.* 177(4):2384-2390, 2006.
- Hayman, A.R. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity.* 41(3):218-223, 2008.
- Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med.* 202(3):345-351, 2005.
- Kim, K., Kim, J., Lee, J., Kim, K., Lee, S. and Kim, N. mafB negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation. *Blood* 109(8):3253-3259, 2007.
- Wagner, E.F., Eferl, R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev* 208: 126-140, 2005.
- Matsubara, T., Myoui, A., Ikeda, F., Hata, K., Yoshikawa, H., Nishimura, R., Yoneda, T. Critical role of cortactin in actin ring formation and osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Metab.* 24(5):368-372, 2006.